



麹菌関連糸状菌の比較ゲノム解析とその利用

著者	寺林 靖宣
内容記述	筑波大学博士（農学）学位論文・平成24年3月23日 授与（甲第6135号）
発行年	2012
URL	http://hdl.handle.net/2241/118002

氏 名 (本籍)	てら ばやし やす のぶ 寺 林 靖 宣 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6135 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	麹菌関連糸状菌の比較ゲノム解析とその利用

主	査	筑波大学教授	博士 (農学)	高 谷 直 樹
副	査	筑波大学教授	農学博士	星 野 貴 行
副	査	筑波大学准教授	博士 (農学)	中 村 顕
副	査	筑波大学准教授	博士 (工学)	野 村 暢 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

Aspergillus 属は古くからさまざまな有用物質の発酵生産や醸造産業に使用されてきた糸状菌である。特に日本では、清酒、味噌、醤油などの食品生産に *Aspergillus* 属が利用されるほか、クエン酸発酵やアミラーゼなどの工業生産にも利用されている。一方、*Aspergillus* 属は、菌類のモデル生物として重要な *A. nidulans* を含むことから、早くからゲノム解析が進められた微生物群の一つである。これまでに、3 種の *Aspergillus* 属のゲノム上にはそれぞれの種に固有の遺伝子領域が存在し、それらが種特異的な生理機能の発現に寄与することが明らかにされた。たとえば、黄麹菌 *A. oryzae* に固有のゲノム領域には、二次代謝産物の生合成にかかわる酵素や工業的に重要な固体培養時に発現する各種の酵素をコードする遺伝子が多く含まれる。こうしたゲノム解析の進展にもかかわらず、ほとんどの二次代謝産物の生合成にかかわる遺伝子については未解明である。そこで、本研究では、本菌の二次代謝産物である麹酸の生産の分子機構を解明することを試みた。一方、固体培養には多くの環境因子が影響することから、培養の制御が困難であるという産業利用上の問題点を持つ。そこで、本研究では、特に培養の通気条件に注目し、通気の変化が本菌の遺伝子発現に及ぼす影響をトランスクリプトーム解析により網羅的に解析するとともに、本菌と *A. nidulans* との通気に対する遺伝子発現の応答の差異を明らかにすることを目指した。

第一章では、これまで未解明であった麹酸の生合成に関与する遺伝子を同定した。麹酸は、*A. oryzae* および *A. flavus* が活発な通気の下で多量に生産する二次代謝産物であり、化粧品の美白成分として工業的に生産される有用物質である。本研究では、まず、麹酸の生産性が異なる 3 つの培養条件下で培養した *A. oryzae* の遺伝子の発現プロファイルを DNA マイクロアレイを用いて比較した。さらに、各条件下で発現している遺伝子の発現量と発現量の各条件間での比を指標として各遺伝子を分類し、麹酸の生産に伴って発現が変化する遺伝子を 9 つ選択した。これらの遺伝子の遺伝子破壊株の解析の結果、麹酸の生合成に関与するフラビン含有型の酸化還元酵素および膜輸送タンパク質をコードすると推定される 2 つの遺伝子 (*KojA* および *KojT*) を見出した。これらの遺伝子は、他の多くの二次代謝系酵素遺伝子と同様に、*A. oryzae* に固有の遺伝子領域内でクラスターを構成していた。

第二章では、まず、*A. oryzae* の低酸素条件下におけるグローバルな遺伝子発現応答を DNA マイクロアレ

イを用いて解析した結果、極めて多くの遺伝子（全遺伝子の 50%）の発現が低酸素条件に応答し変化することが示された。これらと既知の *A. nidulans* の低酸素応答遺伝子との推定アミノ酸配列を比較し、2 種間での双方向ベストヒット（BBH）、片方向ベストヒット（EH）、ヒットなし（NSG）に分類した。BBH と EH のクラスタリング解析の結果、低酸素条件下において、*A. nidulans* および *A. oryzae* では転写および翻訳がそれぞれ抑制されていることが明らかになった。また、低酸素条件下においては、両菌種ともに、アルコール発酵および TCA サイクルの γ -アミノ酪酸シャントを構成する酵素遺伝子の発現を誘導していた。一方、*A. oryzae* は低酸素条件下でグリオキシル酸回路を活性化することが明らかとなった。また、*A. oryzae* の NSG には二次代謝および一酸化窒素代謝に関わる遺伝子が含まれていた。以上の結果から、両菌種は、低酸素環境に応答して、共通あるいは種特異的な遺伝子発現応答を行うことが示された。

本研究により、*A. oryzae* が低酸素条件に応答して遺伝子の発現をグローバルに制御することによって細胞内代謝を調節していることが示された。さらに、*A. oryzae* と *A. nidulans* の遺伝子発現の低酸素応答には、両菌種に共通したものほかに、*A. oryzae* に特有のものが存在することが明らかとなった。一方、これとは反対に、十分な通気の下でのみ発現誘導される麴酸の生産に関わる遺伝子も *A. oryzae* 固有のゲノム領域に存在した。これらのことは、*A. oryzae* がゲノム構造を変化させることによって通気条件に適応してきたことを推察させるものであり、近縁種同士の分子進化を考察する上で重要な知見を与える。一方、培養に際する通気条件は、多くの有用物質の工業生産のために重要である。本研究で得られた知見は、*Aspergillus* 属を用いた発酵・醸造産業の効率化に向けた応用研究に大きく貢献すると期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、麴菌が生産する有用低分子化合物である麴酸の生産に関わる酵素遺伝子を初めて単離した点で新規である。また、その際に、遺伝子発現データとゲノム情報のみを活用したバイオインフォマティクスを駆使した戦略で目的遺伝子を得た。これは、通常、実験室で行われる実験をせずに新規遺伝子を単離することが可能であることを示した点で、今後の生物学の進展に与える影響は大きいと思われる。また、本研究は、糸状菌では例の少ない比較トランスクリプトミクスを行い、2 種の糸状菌の環境因子に対する転写応答の相違を解明した。これらの研究は、糸状菌の分子生物学における新たな分子生物学的アプローチを基にするものであると判断され、今後の糸状菌研究の新展開の礎を築いたものとして高く評価できる。

平成 24 年 1 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。